

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การผลิตตัวอ่อนโคพื้นเมืองภายนอกร่างกายจากไข่ที่ผ่านการแช่แข็ง  
In Vitro Embryo Production of Thai Native Cattle from Frozen – thawed Oocyte

ชื่อผู้วิจัย

เทวินทร์ วงษ์พระลับ	ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ยุพิน ผาสุข	ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศักดิ์ศิริ ศิริเสถียร	ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
นักศึกษาด้านสัตวศาสตร์ช่วยวิจัย	จักรพันธ์ ชาสมบัติ พิริวิทย์ เชื้อวงษ์บุญ พรจิต สอนสีดา เด่นพงษ์ สาม้อง

ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนโครงการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## กิตติกรรมประกาศ

ในการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น และได้ใช้ประโยชน์ร่วมสารเคมี ในการวิจัยบางส่วนจากโครงการมหาวิทยาลัยวิจัย จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ และใคร่ขอขอบพระคุณ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และครุภัณฑ์การวิจัย ทำให้การวิจัยบรรลุจนเสร็จสิ้น

คณะผู้วิจัย

## บทคัดย่อ

โคพื้นเมืองเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจและสังคมในเกษตรกรรมระดับรากหญ้า ประชากรของโคพื้นเมืองพันธุ์แท้ได้ลดจำนวนลงเป็นลำดับ ดังนั้น การอนุรักษ์พันธุกรรมของโคพื้นเมืองจึงมีความสำคัญยิ่ง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงเทคนิคในการเก็บรักษาคุณภาพไข่โคพื้นเมืองแบบแช่แข็ง โดยประกอบด้วย 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ Ethylene glycol (EG) 3 ระดับ (2, 4, 6%) ใน vitrification solution (VS1) และระยะเวลาของการบ่ม (10, 20 นาที) ต่ออัตราการรอดของไข่และอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะ blastocyte จากการศึกษพบว่า EG ระดับ 6% ในระยะเวลาบ่ม 10 นาที ให้ผลดีที่สุด ( $P<0.05$ )

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริม Linoleic a albumin (LAA) และ cholesterol – loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin (CLA) (1, 2 มก/มล) ต่ออัตราการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะ blastocyte จากการศึกษพบว่า อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะ blastocyte เท่ากับ 42.7, 5.5, 4.8, 14.3, 16.7 และ 8.1% ในกลุ่มควบคุมไม่แช่แข็ง, กลุ่มควบคุมแช่แข็ง, กลุ่มที่ได้รับ CLA 1 มก, กลุ่มที่ได้รับ CLA 2 มก, กลุ่มที่ได้รับ LAA 1 มก และกลุ่มที่ได้รับ LAA 2 มก ตามลำดับ โดยกลุ่มที่ได้รับ CLA 2 มก ให้อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะ blastocyst สูงสุด  $P<0.05$  แต่ย่ำต่ำกว่ากลุ่มการควบคุมซึ่งเป็นไข่ที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง ผลจากการศึกษครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การบ่มไข่โคในน้ำยา VS1 ซึ่งมี EG ระดับ 6% เป็นเวลา 10 นาที ก่อนการบ่มในน้ำยา VS2 แล้วแช่แข็ง ให้ผลดีที่สุด และการเลี้ยงไข่จนสมบูรณ์ในน้ำยาที่มี LAA หรือ CLA ในระดับที่เหมาะสมมีผลดีต่อการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะ blastocyst

คำสำคัญ : ไข่, การแช่แข็ง, LAA, CLA, โคพื้นเมือง

## Abstract

Thai native cattle is related to economics and sustainability of small farm holder community. In the last few decades, native cattle population has rapidly declined. Therefore, the preservation of native cattle genetics is necessary. The objective of the present study was to improve the oocyte cryopreservation technique in native cattle. In experiment 1, the effect of ethylene glycol concentrations (2, 4, 6%) in VS1 solution and equilibration times (10, 20 min) on blastocyst rate was compared. The result showed that 6% EG and equilibration time at 10 min gave the highest blastocyst rates of embryos ( $P<0.05$ ). In experiment 2, oocytes were incubated in in vitro maturation (IVM) medium supplemented with 0, 1 and 2 mg/ml linoleic acid albumin. Some mature oocytes were assigned to equilibrate 1 hr in IVM medium supplemented with cholesterol – loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin (1 or 2 mg/ml) prior to vitrification. The blastocyst rate were 42.7, 5.5, 4.8, 14.3, 16.7 and 8.1% in control (unfreeze), control vitrification, incubated with 1 mg/ml CLC, IVM with 2 mg/ml CLC, IVM with 1 mgLAA, and 2 mg LAA, respectively. The results show the exposed oocytes to 2 mg/ml LAA gave the highest blastocyst rate ( $P<0.05$ ). In conclusion, 6% EG in vitrification solution 1 (VS1) and 10 min equilibration time gave the highest blastocyst rate. Addition of LAA to IVM improve the blastocyst yields and exposed the oocytes to CLC prior to vitrification gave beneficial rate of blastocyst.

**Key words :** oocyte, cryopreservation, LAA, CLA, native cattle

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
บทนำ	1
ทบทวนวรรณกรรม	3
วิธีดำเนินงานวิจัย	7
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	11
สรุปและเสนอแนะ	12
เอกสารอ้างอิง	15
ภาคผนวก	19

## สารบัญตาราง

	หน้า
Table 1 Effect of ethylene glycol concentrations in VS1 and equilibration time on viability, cleavage and developmental rates of native cattle oocytes.	13
Table 2 Effect of linoleic acid albumin supplementation in IVM medium and cholesterol loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin incubation on embryo development of vitrified native cattle oocytes.	14